

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

REC'D 10 DEC 1999

PCT/JP 99/05789

日本特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

20.10.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年10月21日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第300219号

出願人

Applicant(s):

社団法人北里研究所

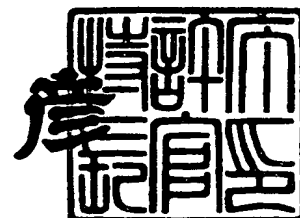
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月26日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3081615

【書類名】	特許願
【整理番号】	K4-002
【提出日】	平成10年10月21日
【あて先】	特許庁長官 殿
【国際特許分類】	A61K 39/39
【発明の名称】	減毒化トキシンを含むワクチン製剤
【請求項の数】	11
【発明者】	
【住所又は居所】	埼玉県北本市荒井六丁目 1 1 1 番地 社団法人北里研究所内
【氏名】	相澤 主税
【発明者】	
【住所又は居所】	埼玉県北本市荒井六丁目 1 1 1 番地 社団法人北里研究所内
【氏名】	鈴木 雄次郎
【発明者】	
【住所又は居所】	埼玉県北本市荒井六丁目 1 1 1 番地 社団法人北里研究所内
【氏名】	佐藤 隆昭
【発明者】	
【住所又は居所】	埼玉県北本市荒井六丁目 1 1 1 番地 社団法人北里研究所内
【氏名】	渡辺 浩志
【発明者】	
【住所又は居所】	埼玉県北本市荒井六丁目 1 1 1 番地 社団法人北里研究所内
【氏名】	服部 信章
【発明者】	
【住所又は居所】	埼玉県北本市荒井六丁目 1 1 1 番地 社団法人北里研究所内

所内

【氏名】 田中 芳武

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区白金五丁目9番1号 社団法人北里研究所内

【氏名】 大村 智

【特許出願人】

【識別番号】 390027214

【氏名又は名称】 社団法人 北里研究所

【代表者】 大村 智

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716335

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 減毒化トキシンを含むワクチン製剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 天然のトキシンを構成するアミノ酸配列中、セリン残基、グルタミン酸残基、およびリジン残基を保持しているトキシン、またはそのサブユニットを減毒化し、残存トキシン活性を天然体の1/2000以下とした減毒化トキシンを含むアジュバント。

【請求項 2】 トキシンが、天然トキシンのアミノ酸配列に対し1、若しくは複数のアミノ酸を置換、挿入、欠失および／または付加したアミノ酸配列によって構成された、アジュバント活性を持つ変異体である請求項 1 のアジュバント。

【請求項 3】 トキシンが天然のトキシンである請求項 1 のアジュバント。

【請求項 4】 トキシンが細菌トキシンである請求項 1-3 のいずれかのアジュバント。

【請求項 5】 トキシンが、コレラトキシン、百日せきトキシン、病原性大腸菌易熱性トキシン、ブドウ球菌 $\alpha$ トキシン、ブドウ球菌 $\beta$ トキシン、および腸炎ピブリオ菌耐熱性溶血トキシンで構成される群から選択される少なくとも1つのトキシンである請求項 4 のアジュバント。

【請求項 6】 トキシンが天然コレラトキシンであり、ホルマリン処理によって減毒化しそのトキシン活性を1/2000以下とした請求項 5 のアジュバント。

【請求項 7】 トキシン活性が1/10000以下である請求項 6 のアジュバント。

【請求項 8】 請求項 1-7 のいずれかに記載のアジュバントを含むワクチン製剤。

【請求項 9】 経鼻接種のためのものである請求項 8 のワクチン製剤。

【請求項 10】 経口接種のためのものである請求項 8 のワクチン製剤。

【請求項 11】 免疫抗原成分として、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風しんウイルス、おたふくかぜウイルス、エイズウイルス、百日せき菌、ジフテリア菌、ヘリコバクター・ピロリ菌、出血性大腸菌(EHEC)、クラミジア原虫、マイコプラズマ原虫、マラリア原虫、コクシジウム原虫、および住血吸虫で構成される群から選択される単一または複数の病原微生物の抗原

を含む請求項 8-10 のいずれかのワクチン製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、減毒化トキシンをアジュバントとして含む、治療と予防に有用なワクチン製剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

ワクチンは、種々の疾病の予防に用いられ、数々の成果をあげてきた。しかしながら、ワクチンの副作用や、また効果が充分でないという例も多くあって、その改善が強く望まれている。現在、人体用または動物用に使用されているワクチンの多くは、病原体あるいは病原体の一部を取り出し、ワクチンの抗原材料として用いる。従って、病原体を構成する成分や病原体を増殖させる媒体の成分がワクチンに混入する可能性を否定できない。これはワクチン接種の際、望ましくない副反応を引き起こす原因となりうる。また、免疫賦与に働く抗原部位そのものも多量に接種されると副反応を誘発する場合もある。

【0003】

このようなことをできるだけ避け、安全性に優れたワクチンを製造する方法として、ワクチン抗原の接種量を少なくすることや、ワクチン抗原の純度を高めること、注射以外の接種ルートで投与することなどが行われる。しかし、一般的には、これに伴いワクチンの免疫力が低下しやすい問題点がある。この点に対する有効な方策として、従来、アジュバントを用いることが実施されてきた。しかし、ここでも、アジュバントの有効性と安全性の向上など、改善すべき課題が残っている。

【0004】

従来、ほとんどのワクチンは注射により接種されている。この結果、血中抗体価が上昇し、それが持続すれば病原微生物の増殖が抑制され、病気が予防される。一方、インフルエンザウイルスなど多くのウイルスや細菌は気道粘膜を介して感染するので、感染の初期段階で罹患を阻止するためには、血中よりも粘膜での

局所免疫を強力に誘発するワクチンが望ましい。このためには局所免疫を誘発しやすくする優れたアジュバントが必要である。すなわち、抗原の種類や接種ルートに応じた、有効で安全性の高い、優れたアジュバントを開発することは、ワクチン開発にとって必要な課題である。

#### 【0005】

注射以外の接種ルートとして注目されるのは経口接種、あるいは経鼻接種である。注射は医療技術者が行わなければならないので、例えば、医療施設が完備されていない状況で広範囲の人々にワクチンを接種するときには、困難をとמונau。これに対し、経口、あるいは経鼻接種では、ワクチン製剤が入手できれば、専門家の指導の下に、直接の助けが無くとも接種が可能である。しかし、一般的にこのような接種ルートでは十分な免疫刺激を得にくいいため、やはりそれに適したアジュバントが求められる。

#### 【0006】

従来、ワクチンにはアジュバントとしてアルミニウム化合物（硫酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムなど）が広く用いられて来た。アルミニウム化合物のゲルは、現在、人体用ワクチンに用い得るほとんど唯一のアジュバントである。しかし、アルミニウムアジュバントにはいくつかの問題点があり、改善が求められている。具体的には、たとえば次のような問題点が指摘されている。

1) 製法、及び取り扱い上の問題として、製造のロットごとに品質が変化しやすいので、大量生産に不向きで、加えてカラム操作に馴染みにくいなど、取り扱い上も不便である。

2) 効果上の問題として、液性免疫の誘発力に優れているものの、これに比べて細胞性免疫の誘発力が低いので、用いる抗原に限界がある。

#### 【0007】

これらの改善を目的として、細菌トキシンなど新しいアジュバントの研究、開発が進められている。それらを例示すれば次のものが挙げられる。

1. コレラトキシン等、細菌トキシン
2. サポニン類、高級脂肪酸など界面活性作用物質。



3. BCG、ムラミルペプチド等、微生物または植物成分。
4. インターロイキンなどのサイトカイン類、熱ショック蛋白質などの機能蛋白質。
5. 合成ポリアニオン、ポリカチオンなど。
6. マイクロキャリアなど。

## 【0008】

細菌トキシンがアジュバント活性（すなわち、抗原特異的抗体産生増強作用）を有することは知られている。その中で、コレラトキシンのアジュバント活性は相対的に高い(J. Holmgren et al., Vaccine 11, 1179-1184, 1993)。本発明者らは、コレラトキシンや大腸菌易熱トキシン、およびそのサブユニットをアジュバントとして含むワクチンの開発研究を続けてきた（特開平2-243633号）。

## 【0009】

このほか、現在進行中のコレラトキシン、大腸菌易熱トキシン、百日せきトキシンなどをアジュバントとするワクチンの開発研究を例示すれば、つぎのものが挙げられる。すなわち、インフルエンザワクチン(K. Komase et al., Vaccine 16, 248-254, 1998; A. S. Tamura et al., Eur. J. Immunol. 21, 1337-1344, 1991)、ヘルペスシンプレックスウイルス(C. M. Richards et al., Vaccine 15, 1065-1069, 1997)、HIV-Iワクチン(I. M. Belyakov et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1709-1714, 1998)、ヘリコバクター・ピロリワクチン(R. Weltzin et al., Vaccine 15, 370-378, 1997)、トキソプラズマワクチン(I. Bourgiun et al., FEMS Immunol. Med. Microbiol 12, 121-126, 1995)、麻しんワクチン(C. D. Partidos et al., Immunology 89, 483-487, 1996)、ポリオワクチンなどである。

## 【0010】

しかし細菌トキシンは、本来ヒトに対して毒性を示す点で、アジュバントとして加えたワクチンを臨床使用する際に問題となる可能性がある。本発明者らは、アジュバントとして有効なトキシンの濃度はヒトや動物に毒性を示す量よりも十分に低く、ワクチンに使用しても安全であると考えて、経鼻接種を想定した繰り返し投与に伴う問題についても検討し既に発表している (S. Tamura et al., Va

ccine 15,1784-1790,1997)。それでも多くの専門家は、ヒトと実験動物のコレラトキシン感受性の差や下痢を引き起こす可能性などの理由をあげて、安全性に対する懸念を表明している (M.M. Levine et al. Microb. Rev.47,510-550, 1983)。

#### 【0011】

細菌トキシンの優れた免疫増強活性を生かしながら安全性の問題を解決するために、以下の方法が提案されてきた。しかしいずれの方法も、安全性とアジュバント活性の両立という課題を完全に達成するものとは言いがたい。

#### 【0012】

##### (1) 化学的、物理的处理による減毒化

ホルマリン、グルタルアルデヒド、酸、アルカリなどの存在下、またはトキシンにとって過酷な温度条件下などで処理し、トキシン活性を低下させ、なおかつ、アジュバント活性を残す方法である。グルタルアルデヒド処理により天然体の約1/1000のトキシン活性にしたコレラトキシンは、アジュバント活性を示すことが知られている (X. Liang et al., J. Immunol.143,484-490,1989)。しかし天然体の1/1000のトキシン活性では安全性の点からは不十分と評価される。

#### 【0013】

##### (2) 変異株の生産する交差反応性変異蛋白質の探索

トキシン生産性細菌を変異誘起化学薬品で処理し、得られた変異株の生産するトキシンの中から、アジュバント活性を維持した目的物を探索する方法である。百日せきトキシン生産菌の変異株の培養液中から、トキシン活性が低く、かつ、抗百日せきトキシン抗体と反応する交差反応性蛋白質 (CRM) が見いだされた。この変異トキシンは、免疫原性があり、百日せきワクチン抗原の候補と考えられる (Y. Sato et al., Devop. Biolo. Standard.73, 93-107, 1991)。それと同時に低トキシン活性のアジュバントとなる可能性があるが、トキシン活性の程度とアジュバント活性については報告されていない。

#### 【0014】

ジフテリアトキシンの交差反応性蛋白質CRM-197 (DT-G52E) (T.Uchida et al., J. Biol. Chem.248,3838-3844,1973; G.Giannini et al., Nucleic Acids Res.1

2,4063-4069,1984)、緑膿菌エンテロトキシンAの交差反応性蛋白質 CRM-66(H462 Y) ( S.J.Cryz et al.,Rev.Infec.Dis.5 Suppl.5,S992-S997,1983. S.P.Kessler et al.,J.Biol.Chem.267,19107-19111,1992)などは、ADP-リボシル化酵素(ADP-ribosyltransferase)活性を実質的に消失した変異体トキシンとして報告された。これらの変異体トキシンにおいては、ADP-リボシル化酵素活性がトキシン活性の唯一の指標とされており、他の機構による残存トキシン活性は否定されていない。したがってこれらの変異体には、他のトキシン活性を伴っている可能性がある。しかもCRM-197 (DT-G52E) は、多糖抗原と化学結合させた場合、アジュバント活性はあるものの十分な抗体価を得られないので、第二のアジュバントを必要とすると報告されている (G.S.Bixler et al.,Adv.Exp.Med.Biol.303,185-190,1991. D.M.Granoff et al.,Vaccine 11 Suppl.1,S46-S51,1993)。

#### 【0015】

##### (3) 遺伝子操作による減毒化変異トキシンの作成

遺伝子組み換え技術により、トキシン分子のアミノ酸残基の1ないし数箇所を人為的に変化させてトキシン活性を下げ、なおかつアジュバント活性を維持した組み換えトキシンを作成する方法である。一例として大腸菌易熱トキシンのN末端から7番目または192番目のアルギニン残基(Arg/R)をリジン残基(Lys/K)に (LT-R7K, M.T. De Magistris et al., Dev. Biol. Stand. 92, 123-126, 1998)、あるいはグリシン残基(Gly/G)に (LT-R192G, B. L. Dickinson et al., Infection Immun.63,1617-1623,1995) 置換した組み換え体は、実質的にトキシン活性が消失し、なおアジュバント活性があったと報告された。

#### 【0016】

しかし、別のグループの試験によれば、上記の組み換え体には無視できない程度のトキシン活性がみとめられ、また天然体に比較して不安定性であり、同じレベルの抗体価を与えるためには天然トキシンより多量に用いなければならないと報告された (K. Komase et al., Vaccine 16,248-254,1998; C.C.R. Grant et al., Infect. Immun.62,4270-4278,1994)。複数の活性によってトキシン活性がもたらされている場合、そのうちのいずれかの活性が低下すると他の活性が顕在化することがある。トキシンの減毒化には、常にこの現象が伴うので、トキシン活

性の指標は慎重に選択されるべきである。以上のように、これまで低毒性であると報告された減毒化アジュバントは、アジュバント活性、安全性、安定性、あるいは生産性の問題が十分に解決されていない。また、アミノ酸の置換に基づいてトキシン活性の低下とアジュバント活性の維持という相反する課題を達成するのは、多くのスクリーニングを繰り返さなければならないために、時間のかかる作業といえることができる。

## 【0017】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、トキシンの優れたアジュバント活性を残しながら、トキシン活性が実質的に無い減毒化トキシンを新規アジュバントとして提供することである。更に本発明は、このような安全性と有効性とを兼ね備え、しかもより容易な手法によって得ることができるアジュバントを利用したワクチンの提供を課題としている。より具体的には、ワクチンの使用量を減らしたり、注射以外の接種ルートを用いても免疫力が低下しないようなワクチンの提供を課題としている。

## 【0018】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは各種トキシンのトキシン活性軽減方法について研究をすすめた結果、化学処理により得ることができる、トキシン活性を実質的に持たない減毒化トキシンが、実用的な水準のアジュバント活性を有する事を見い出した。そしてこの減毒化トキシンに高い安全性が期待できることを確認して本発明を完成した。すなわち上記の課題を達成する手段は、下記の本発明により実現される。

〔1〕天然のトキシンを構成するアミノ酸配列中、セリン残基、グルタミン酸残基、およびリジン残基を保持しているトキシン、またはそのサブユニットを減毒化し、残存トキシン活性を天然体の1/2000以下とした減毒化トキシンを含むアジュバント。

〔2〕トキシンが、天然トキシンのアミノ酸配列に対し1、若しくは複数のアミノ酸を置換、挿入、欠失および／または付加したアミノ酸配列によって構成された、アジュバント活性を持つ変異体である〔1〕のアジュバント。

〔3〕トキシンが天然のトキシンである〔1〕のアジュバント。

〔4〕トキシンが細菌トキシンである〔1〕－〔3〕のいずれかのアジュバント

〔5〕トキシンが、コレラトキシン、百日せきトキシン、病原性大腸菌易熱性トキシン、ブドウ球菌 $\alpha$ トキシン、ブドウ球菌 $\beta$ トキシン、および腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシンで構成される群から選択される少なくとも1つのトキシンである〔4〕のアジュバント。

〔6〕トキシンが天然コレラトキシンであり、ホルマリン処理によって減毒化しそのトキシン活性を1/2000以下とした〔5〕のアジュバント。

〔7〕トキシン活性が1/10000以下である〔6〕のアジュバント。

〔8〕〔1〕－〔7〕のいずれかのアジュバントを含むワクチン製剤。

〔9〕経鼻接種のためのものである〔8〕のワクチン製剤。

〔10〕経口接種のためのものである〔8〕のワクチン製剤。

〔11〕免疫抗原成分として、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、エイズウイルス、百日せき菌、ジフテリア菌、ヘリコバクター・ピロリ菌、出血性大腸菌(EHEC)、クラミジア原虫、マイコプラズマ原虫、マラリア原虫、コクシジジウム原虫、および住血吸虫で構成される群から選択される単一または複数の病原微生物の抗原を含む〔8〕－〔10〕のいずれかのワクチン製剤。

#### 【0019】

本発明のアジュバントを構成するトキシンは、トキシン活性を実質的に持たず、免疫増強活性は残っている減毒化トキシンである。本明細書において、トキシン活性を実質的に持たないとは、天然トキシンを基準として1/2000以下のトキシン活性しか保持していないことと定義される。コレラトキシン、大腸菌易熱トキシン、百日せきトキシン、ジフテリアトキシン、あるいは破傷風トキシンといった、代表的な細菌トキシンの活性は、たとえばADP-リボシル化酵素活性を指標として比較することができる。すなわち、たとえばADP-リボシル化酵素活性が1/2000であれば、それはトキシン活性が1/2000であることを意味する。先行技術文献には各種減毒化トキシンについてADPリボシル化酵素活性が検出されないとしている報告があるが、定量的な比較を伴わないものは、その判断基準が明確でない

のでトキシン活性の評価方法として適切ではない。また、他の報告との比較が困難となる点で問題がある。本発明では、トキシン活性の比較におけるこのような弊害を避けるために、天然トキシンの活性を基準として、その1/2000という比較基準を採用した。コレラトキシンや、大腸菌易熱トキシンのような、強力な生理活性を持った細菌トキシンであっても、1/2000という高レベルな減毒化によって、生体への投与におけるその安全性は飛躍的に高まる一方、免疫刺激活性は維持される。

#### 【0020】

この他、動物細胞や実験動物の生理的な応答反応を指標としたバイオアッセイの結果を指標としてトキシン活性の定量的な比較を行うこともできる。いずれにせよ、そのトキシンが持つ活性を鋭敏に反映する指標により、活性の比較を行って1/2000以下であることを確認するのが望ましい。また、多くのトキシンは多面的な生理活性を持っていることから、たとえ鋭敏な指標を利用するとしても、性格の異なる複数の指標を組み合わせてトキシン活性を評価することは安全性の確保の上で望ましいやり方である。各トキシンとその活性については後述する。本発明による減毒化トキシンは、通常は1/2000以下、望ましい態様においては1/1000以下のトキシン活性を持つものとする。

#### 【0021】

トキシンの減毒化は、公知の方法によって達成することができる。すなわち、化学的な処理、あるいは物理的処理による減毒化技術が公知である。減毒化処理にともなって、立体構造の不可逆的な変化、サブユニットの解離、あるいはペプチドの断片化といった様々な構造変化が起きる可能性がある。しかし、前記3種類のアミノ酸残基を保持したトキシンを用いれば、アジュバント活性を維持することが可能である。これら公知の手法を用い、前記トキシン活性の指標を与える分析方法によってトキシン活性が少なくとも天然のトキシン活性の1/2000以下となる条件を経験的に設定すれば良い。具体的な減毒化の条件については、後に詳細に述べる。

#### 【0022】

本発明のトキシンとしては、後に具体的な例を列挙するようないずれのトキシ

ンを用いる場合であっても、天然体のトキシンを構成するアミノ酸配列中、セリン残基、グルタミン酸残基、およびリジン残基は保持されていなければならない。本発明における望ましいトキシンは、天然体トキシンである。天然体トキシンを選択することにより、高いアジュバント活性を期待できると共に、変異体をスクリーニングする手間を省くことができる。なお、アジュバント活性の維持に重要なこれらのアミノ酸残基以外については、1、若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、挿入および／または付加したアミノ酸配列を持つ変異体であることができる。またアミノ酸配列のみならず、他のトキシン構成成分である糖残基の変異体であることもできる。

### 【0023】

蛋白質の機能発現にとって、アミノ酸残基の官能基は重要である。例えば、OH基を持つセリン残基やスレオニン残基など、COOH基を持つグルタミン酸残基やアスパラギン酸残基など、あるいはNH<sub>2</sub>基を持つリジン残基やアルギニン残基などが活性中心を構成し、活性発現に重要な役割を果たしている場合が多い。多くの酵素や機能性蛋白質に見られるとおり、トキシンにおいてもその生物活性、例えば、酵素活性、免疫増強活性、受容体結合活性などの活性発現に、トキシン分子を構成するアミノ酸残基中のOH基、COOH基、NH<sub>2</sub>基などが深く関与すると考えられる。更に、例えばOH基の重要性を示す別の指標として構成アミノ酸数を見た場合、OH基を持つアミノ酸であるセリン残基、スレオニン残基、そしてチロシン残基は、コレラトキシン、ヒト型大腸菌易熱トキシン、百日せきトキシンのポリペプチド中に、3種のアミノ酸残基数の合計でそれぞれ約18%、22%、20%を占める。この数字は、それだけ活性中心に関与する可能性が高いことを示す。従って、活性中心に深く関与するこれらのアミノ酸残基を欠失したり、あるいは別のアミノ酸残基に置換した組み換え変異体トキシンでは、著しい立体構造変化を引き起こしやすく、トキシン活性だけでなく、免疫増強活性も同時に消失する可能性が高い。この推定を支持する例として、本発明者らは大腸菌易熱トキシンのN末端から112番目のグルタミン酸残基をリジン残基に置換した組み換え変異体では、トキシン活性が約1/2,860に低下するとともに、免疫増強活性も失われる事実を観察した (K. Komase et al., Vaccine 16, 248-254, 1998)。

## 【0024】

このような事実に基づき、本発明者らは、上記3種類の官能基を持つアミノ酸残基の中から、アジュバント活性を支える重要なアミノ酸残基として、セリン残基、グルタミン酸残基、およびリジン残基の3種を選択した。これらのアミノ酸残基は、各種トキシンの活性をもたらす重要なアミノ酸残基として知られている。以下に、これらのアミノ酸残基の置換によるトキシン活性の変化に関する報告をまとめる。トキシン活性をnegativeと表記した報告は、使用した測定条件では実質的に残存トキシン活性は検出されなかったものの、定量的な比較が行われていないものである。大腸菌易熱トキシンにおいては、アジュバント活性が認められているが免疫増強活性は十分なものではない。またコレラトキシン変異体においても、天然コレラトキシンと同じレベルの免疫増強活性を与えるためには天然コレラトキシンの10倍量が必要とされている。なおアミノ酸の置換について「他」と記載したものでは、この他のアミノ酸残基の置換が同時に行われている。このように、グルタミン酸残基やセリン残基は、しばしば置換の標的とされる重要なアミノ酸残基である一方で、その置換によってアジュバント活性を失う、あるいは減衰する報告が多い。本発明においては、これらの置換の標的となった重要なアミノ酸残基に加え、塩基性のアミノ酸の代表としてNH<sub>2</sub>基を持つリジン残基を加えて、アジュバント活性を高度に維持するために必要なアミノ酸残基とした。リジン残基はトキシンの減毒化において重要な役割を持っている。たとえばホルマリン処理においては、リジンが持つεNH<sub>2</sub>基にホルマリンがアタックし、ここにシッフの塩基を生成することによって立体構造の変化をもたらし、その結果として減毒化が成立するとされている。したがって、リジン残基を保持させることで、1/2000以下という高度な減毒化を容易に達成することができる。

## 【0025】

【表1】

トキシンの種類	アミノ酸残基の置換 (文献)	トキシン活性の変化と アジュバント活性
---------	-------------------	------------------------



大腸菌易熱トキシン	112位Glu→Lys (1)	Y: 1/2860	—
	63位Ser→Lys (2)	A: negative	+
コレラトキシン	63位Ser→Lys (2)	A: negative	±
	61位Ser→Phe (3)	C:1/1000000	++
	112位Glu→Lys (4)	C:1/1000000	++
百日せきトキシン	129位Glu→Gly他 (5)	Y:1/1000000	—
ジフテリア毒素	162位Glu→Lys他 (6)	A: negative	—

トキシン活性の指標 A: ADP-リボシル化酵素活性

C: CHO細胞spindle形成試験

Y: Y-1細胞変形試験

#### 論文

- (1) Komae et al., Vaccine 16, 248-254, 1998
- (2) G. Douce et al., Infec. Immun. 65, 2821-2828, 1997
- (3) S. Yamamoto Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 5267-5272, 1997
- (4) S. Yamamoto J. Exp. Med. 185, 1203-1210, 1997
- (5) M. Roberts et al., Infec. Immun. 63, 2100-2108, 1995
- (6) T. Uchida et al., J. Biol. Chem. 248, 3838-3844, 1973

#### 【0026】

1/2000以下、あるいは1/10000以下という高度に減毒化したトキシンが高い免疫増強活性を有することは、先行文献から予想できないことである。たとえばコレラトキシンの主要なトキシン作用は、Aサブユニットが担うとされている。そのトキシン活性は、Aサブユニットの強いADP-リボシル化酵素活性により、トキシンが進入した細胞内でcAMP濃度バランスの破壊が起きることによって発現すると説明されている。大腸菌易熱トキシンも、同じ機序によりトキシン活性を発現する。大腸菌易熱トキシンの組み換え変異体において、ADP-リボシル化酵素活性とアジュバント活性との相関関係を解析した研究が報告されている。その結果、両活性は互いに密接に繋がっており、両者は分離不可能である、との見解が提出された(N.T. Lycke et al., Eur. J. Immunol. 22, 2277-2281, 1992)。他の報告でも

、酵素活性を低下させた組み換え変異体トキシンは、同時にアジュバント活性も低下することが報告された(例えば、J.D.Clements et al, Vaccine 6, 269-277, 1988、試験材料；大腸菌易熱トキシン。; W. J. Black et al., Science 240(4852), 656-659, 1988, 試験材料；百日せき菌トキシン)。

## 【0027】

すなわち従来の学説では、トキシン活性を大幅に低下させた場合、免疫増強活性もそれだけ低下するので、安全性の高いアジュバントの開発に繋がらないと考えられていたのである。ところが本発明の減毒化トキシンによって、トキシン活性が天然体の1/2000以下、例えば1/10000であっても、免疫増強活性は天然体と実質的に同等である場合があることが明らかとなった。このことは本発明者らの長年の研究により初めて明らかにされた新しい知見である。

## 【0028】

減毒化トキシンにおいて、トキシン活性と免疫増強活性が分離される機構は現在明らかではない。

しかし、同様の現象として、トキシイドを抗原として用いる多くのワクチンに見られるとおり、減毒化トキシンが免疫原性を保持している場合が知られていることから、その機構をもとに考察する。たとえば減毒化コレラトキシンについては、以下のように考えられる。トキシン活性(たとえばADP-リボシル化酵素; ADP-ribosyltransferase活性)発現には、一定の大きさのオリゴペプチドが形成する特異な立体構造が必要なので、わずかの構造変化も活性の消失に繋がる。これに対し、免疫増強活性は、トキシン分子のままで、あるいはより小さいペプチドとして効果が発現する場合があり、トキシン蛋白質の一次構造のわずかな変化では、活性が保持される可能性がある。

## 【0029】

コレラトキシンがアジュバントとして働く場合、種々の免疫増強反応を引き起こすことが知られている。例えば、(1) 抗原の透過性を促進する。受容体と結合して、ヘルパーT細胞を活性化する。ヘルパーT細胞の1型と2型の増殖を促進する。また、(2) 種々のサイトカイン類、例えば、インターフェロンガンマ、インターロイキン1、4、5、12などの産生を促進する。これらの免疫応答において

は、(1)の場合にはトキシン分子がその構造を保持したまま効果を発揮し、一方、(2)の場合には、ペプチド断片に分解されて効果を発現する可能性が考えられる。しかし、この点に関して、詳細は十分には説明されていない。

#### 【0030】

抗原蛋白質は、プロテアソームの作用で一連のプロセッシングを受け、ペプチド断片となり、抗原提示細胞で提示され、これが刺激となり、その後の一連の免疫反応、例えば、ヘルパーT細胞の活性化と増殖、種々のサイトカイン類の産生、さらにB細胞による抗体生産などが引き起こされる。トキシンのアジュバント効果が発現される過程で、これと類似の機構が働く可能性が考えられる。

#### 【0031】

上記の可能性は、現段階では仮説であるが、トキシン活性は主に一つの機構に基づくのに対し、アジュバント活性は複数の機構により発揮されるので、減毒化トキシンにおいて、トキシン活性が消失しても、免疫増強活性は残る事が起こりうる、と考えられる。

#### 【0032】

(トキシン)

本発明によるアジュバントを構成する減毒化トキシンとは、細菌、真菌または動植物といった生物が生産する天然体トキシンの減毒化体である。本発明のアジュバントに利用されるトキシンとしては、特に細菌トキシンが望ましい。細菌トキシンは、大量生産が容易なことから経済的に有利であり、またたとえばコレラトキシンのようにアジュバント活性の点でも優れたトキシンを含んでいる。これらは単純蛋白質、または複合蛋白質である。すなわち本発明におけるトキシンとは、自然界の生物が生産する蛋白質性トキシン活性物質、その断片、サブユニットを意味する。なお、アジュバント活性を期待できない分子量が500以下の低分子トキシンは含まれない。また、有機合成化学により製造される化合物の一部に含まれる毒性物質(毒物)や有害重金属類についても、本発明によるトキシンを構成するものではない。

#### 【0033】

本発明における天然体トキシンとして次のものが例示される。

細菌トキシン：コレラトキシン、ジフテリアトキシン、百日せきトキシン、ブドウ球菌 $\alpha$ トキシン、ブドウ球菌 $\beta$ トキシン、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシン、病原性大腸菌易熱性トキシン、シガトキシン、および緑膿菌エンテロトキシンAなど

## 【0034】

真菌トキシン：カンジトキシン、フミガトキシン、および茸類のトキシンなど  
植物トキシン：リシンなど  
動物トキシン：蛇毒、蜂毒、節足動物トキシン（例えばサソリ毒）など

## 【0035】

トキシンは色素、抗生物質などと同じく、いわゆる、二次代謝産物である。トキシン生産性の微生物や動植物における本来の生理的役割は必ずしも明白でない場合が多い。二次代謝産物生産の特徴として、トキシン生産能は菌株（動植物においては個体）特異的であり、その種属の生物ならどの個体も生産する訳ではない。同一の種の菌株が同一のトキシンを生産する頻度はトキシンにより一定しない。同一のトキシンが亜種、近縁種によっても生産される。野生株でも近縁種でも、人工変異株でも、生産されるトキシンは、構造が部分的に少しずつ変化した多成分のトキシンを生産する場合が多い。本発明のアジュバントに複数種のトキシン混合物を使用することもできる。また、トキシン分子がいくつかのサブユニットで構成される場合、本発明のアジュバントにはアジュバント活性に必要なサブユニットのみを単独で、あるいは複数のサブユニットを選択して利用することもできる。サブユニットで構成されるトキシンとして、コレラトキシン、百日せきトキシン、ジフテリアトキシン、病原性大腸菌易熱性トキシン、およびカンジトキシンなどが例示される。トキシンを構成するサブユニットは、一般にサブユニット単位でもアジュバント活性を示す（特開平2-243633号）。したがって、本発明のトキシンはそれらのサブユニットであることもできる。

## 【0036】

更に本発明のアジュバントを構成するトキシンとして、天然体トキシンのアミノ酸配列や、糖鎖に代表されるその他の構造を改変した変異体を用いることもできる。変異体トキシンは、トキシン生産性野生株または近縁種を変異誘起剤で処

理して作成された人工変異株によって生産される。この場合を人工変異体トキシンと記載する。変異体トキシンはまた遺伝子組み換え技術を利用して変異体トキシン生産能を付与された組み換え細胞生物によっても生産される。後者の場合を組み換え変異体トキシンと記載する。

#### 【0037】

変異体トキシンは天然体分子構造の一部分が変化しているので、トキシン分子の構造変化に伴い、通常、トキシンの特性の一部を失う。しかし一方で免疫増強活性を保持する場合もありえる。変異体トキシンのトキシン活性が十分に低く、天然体の1/2000以下であれば、免疫増強活性を確認後、そのまま減毒化トキシンとして本発明のアジュバントに利用できる。また、そうでない場合、変異体トキシンを上記の方法で化学的または物理的处理により、さらに減毒化することによってアジュバントとして利用することができるようになる。変異体トキシンは、それを含むワクチンの使用条件下で、安定であるものが望ましい。またトキシン活性が復活しにくいものが望ましい。トキシン活性の復活とは、様々な処理によって大幅に低下したトキシン活性が、処理後の時間経過に伴って回復する現象を指す。

#### 【0038】

人工変異体トキシンにおける構造変化の部分は、保持すべきアミノ酸残基として特定した3アミノ酸残基を除けば、その変異体のアジュバント活性を有する限り特に限定されない。例えば、トキシン分子を構成するオリゴペプチド部分のアミノ酸残基、オリゴ糖部分の糖残基、あるいは有機酸部分などの一カ所、あるいは複数の変化が例示される。

#### 【0039】

人工変異体においては、変異するアミノ酸残基、あるいは糖残基を人為的に選択することができないから、通常は変異の内容をあらかじめ規定することは困難である。しかし、研究の過程においては、トキシン活性の低下や免疫増強活性は容易に確認することができるので、本発明の目的に合う変異体を得ることができる。また、予想外のアミノ酸残基が変化した変異体を見いだせるという利点がある。

## 【0040】

一方、組み換え変異体トキシンの場合には、変異するアミノ酸残基、あるいは糖残基を人為的に選択し、その通りの変異を導入することができる。例えば、トキシン分子を構成するオリゴペプチド部分のアミノ酸残基、オリゴ糖部分の糖残基、あるいは有機酸部分などの一カ所、あるいは二カ所以上の変異が例示される。免疫増強活性発現にとって重要なペプチド断片を含むオリゴペプチド断片も本発明のアジュバントに含まれる。

## 【0041】

## 【発明の実施の形態】

天然体トキシンおよび変異体トキシンの製造

天然体トキシンは、野生株の生産物として取得できる。または高力価生産性変異株など種々の人工変異株の生産物として取得できる。あるいは、遺伝子操作により野生株などの遺伝子を組み込んだ同種または異種の組み換え生物細胞の生産物として取得できる。更には合成化学的手段により製造することもできる。

## 【0042】

本発明に用いる細菌トキシンは、例えば、トキシン生産性細菌の培養物を原料として公知の方法を組み合わせて、抽出、分離、精製し、製造することができる。コレラトキシンについて例示すれば次のとおりである。トキシン生産性コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) を36℃で18時間培養する。培養液を種菌として寒天培地上、または、液体培地で大量培養する。培養後、培養上清（液体培養の場合）を硫酸沈殿、または限外濾過で濃縮する。この後、セファデックスなどを用いる公知のカラムクロマトグラフィー法、超遠心法、ゲル電気泳動法などを組み合わせてトキシンを精製する。培養中並びに精製途中の試料のトキシン活性は後述の方法により測定する。

## 【0043】

また、百日せきトキシンについて例示すれば次のとおりである。百日せき菌 (*Bordetella pertussis*) 東浜株 I相菌をBordet-Gengou 培地で種培養し、これをCohen-Wheeler 培地に移植し、48時間培養し、その培養上清を出発原料として用いる。培養上清をヒドロキシアパタイトカラムにアプライし、0.1 Mリン酸緩

衝液 (pH 7.0) で洗浄し、ついで0.5 M NaCl添加 0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) で溶出する。さらに、CM-セファロースや適当なアフィニティーリガンドを結合した担体を用いるカラムクロマトグラフィーにより精製する。培養中並びに精製途中の試料のトキシン活性は公知の方法により測定する。

#### 【0044】

この他、茸の産生するトキシンでは、自生、または栽培された茸から抽出、精製することができる。動物の産生するトキシンの製造方法は、トキシン生産性動物、例えば、蛇を飼育し、口顎部分のトキシン産生器官から採取する。もちろん既にトキシンが市販されている場合には、トキシン製造メーカーから購入すればよい。トキシン生産工程とトキシンの品質は、当該生物製剤基準と関連法規に従うかぎり、種々変更することができる。

#### 【0045】

人工変異体トキシンは、トキシン生産性野生株から誘導される人工変異株により生産される。人工変異株は野生株を変異誘起剤などで処理して作成される。変異誘起処理方法としては、N-methyl-N' nitro-N-nitrosoguanidine、nitrosourea、nitrogen mustardなどの化学薬品による処理、および紫外線照射、コバルト60などによる放射線照射、加温などの物理化学的処理などが公知である。人工変異株の培養法、トキシンの精製法、活性確認法などは、野生株の場合に準じる。

#### 【0046】

組み換え変異体トキシンは組み換え細胞生物によっても生産される。その為の方法は、公知である。大腸菌易熱トキシンの組み換え変異体の製造方法を例示する。患者分離の易熱トキシン生産株 (*Escherichia coli* 1032株) から、例えば田村らの方法 (S. Tamura et al., Vaccine 12, 1083-1089, 1994) により高力価トキシン生産性組み換え株を作成する。まず、易熱トキシンと耐熱トキシンの両方の遺伝子をコードするプラスミド (65kbp) を分離する。プラスミドから制限酵素処理などにより易熱トキシン遺伝子 (6.7kbp) を切り出し、pBR322などのプラスミドに連結する。PCR法などで増幅した後、易熱トキシン遺伝子を別の発現ベクターに連結する。次に、Hoらの方法 (S.N.Ho et al., Gene 77, 51-59, 1989) などにより、このベクター上で位置特異的変異処理を行い、続いて選択的プライマー

を用いてPCR法で増幅し、組み換え変異体トキシンを生産する組み換え大腸菌の菌株を作成する。つぎにClementsらの方法 (J.D. Clements et al., Infect. Immun. 24, 760-769, 1979) に従って培養し、培養液から限外濾過、硫酸アンモニウム沈殿、アガロースゲルクロマトグラフィー (ガラクトース添加緩衝液で溶出) などにより精製し、ヒト型大腸菌易熱トキシンの組み換え変異体トキシンを得ることができる。あるいは、前記プロセス中で位置特異的変異処理を行わなければ、天然体トキシンを得ることができる。

#### 【0047】

たとえば上記のとおり、位置特異的変異処理法などを応用すれば、トキシンのアミノ酸配列のなかで、任意の部位のアミノ酸残基を別の残基に変化させることも可能となっている。逆に、特定の部位の特定のアミノ酸残基、たとえばグルタミン酸残基を変化させないで保持することが可能である。糖残基についても基本的に同様である。得られた変異体の中から、アジュバント活性を維持しうるものを選択し本発明のトキシン変異体とする。なお、この変異体の持つトキシン活性については、任意のレベルにあることができる。すなわち、アジュバント活性のみならず、トキシン活性について天然のものと同等の水準に有れば、天然のものと同様に適当な減毒化処理を施してアジュバントとすることができる。あるいは、もしもアジュバント活性を持ちながらトキシン活性の低い望ましい変異体を得ることができれば、そのまま、若しくは若干の減毒化処理の後に減毒化トキシンとしてアジュバントに利用することができる。変異体を得るには、いくつかの思考錯誤的な実験が必要となるが、反面得られた組み換え変異体トキシンは、一般的に、トキシン活性が復帰しにくい利点がある。

#### 【0048】

##### トキシンの減毒化方法

野生株、人工変異株、あるいは組み換え変異株が生産するトキシンは、減毒化の後に、免疫増強活性があることを確認し、本発明のアジュバントとする。トキシンの減毒化方法は公知の方法を使用できる。減毒化方法を例示すれば次のとおりである。本発明における減毒化とは、なんらかの手段によりトキシン活性を減ずることを意味し、ここに例示する方法に限定されるものではない。しかし、こ



これらの方法は簡便で確実な処理効果を期待できる有利な方法である。

これらの減毒化方法はいずれもトキシイド化等に利用されている公知の手法である。しかし本発明においては1/2000以下という高度な減毒化が必要である。したがって、公知の手法と同様の原理に基づくものの、より過酷な条件が求められる。具体的には、たとえばコレラトキシンのホルマリン処理の場合、処理温度は5℃-30℃（通常は5℃）、ホルマリン濃度を0.5%-0.8%（通常は0.3%）、そして処理日数を20-70日（やはり通常は7-14日程度）等が例示される。

#### 【0049】

##### 〔1〕化学的方法

トキシンを適当な濃度で緩衝液に溶解し、トキシンが安定な範囲（通常pH5-8）にpHを調節しながら、適当な濃度（通常0.01-1.0%）の処理薬剤たとえば、ホルマリン、グルタルアルデヒド、フェノール、沃素、酸無水物、胆汁酸等の界面活性作用物質などを徐々に加え、適温（例えば5℃）で保温処理する。処理後、透析など公知の方法により、処理薬剤を除去し、残存トキシン活性を測定する。必要に応じて、減毒化トキシンの使用温度、例えば37℃で再度保温し、トキシン活性が復帰しないことを確認する。こうして、減毒化トキシンが得られる。この方法は、従来から広く実施されてきたトキシイド化の方法に準じるものであり、大量の製造にも適している。しかし、トキシン活性が復帰しないような処理方法が望ましい。その為の方法として、減毒化処理剤、例えばホルマリンの濃度に見合う量のリジンを同時に添加する方法、あるいは、減毒化処理後、還元処理をする方法などが公知である。

#### 【0050】

##### 〔2〕物理的方法

トキシンを適当な濃度で緩衝液に溶解し、酸性pH（例えばpH2-4）、アルカリpH（例えばpH8-11）など、トキシン活性が通常失われるpHに調節しながら、所定の適温で保温処理する。または、トキシン活性が通常失われる温度（例えば40℃以上）に調節しながら、保温処理する。あるいは、所定の適当な波長の音波、電磁波などの照射処理をする。処理途中と処理後、試料の残存トキシン活性を測定する。必要に応じて、減毒化トキシンを適当な温度、例えば37℃で再度保温し、

トキシン活性が復帰しないことを確認する。免疫増強活性があることを確認し、減毒化トキシンを得ることができる。なお、化学的な処理と物理的な処理とは、適宜組み合わせて用いることができる。

【0051】

#### 残存トキシン活性の確認方法

残存トキシン活性の測定は、公知の方法による（例えば、国立予防衛生研究所学友会編集、“ワクチンハンドブック”、丸善、1994年。村田良介他編集“タンパク毒素”上巻、下巻、講談社サイエンティフィック、1972年 など）。その方法を分類すれば、酵素活性測定法、動物細胞の生理的応答測定法、実験動物の生理的応答測定法、あるいは実験動物の生死判定法、などに分けられる。具体的な測定方法はトキシンにより異なるが、たとえば以下のような指標を例示することができる。これらの指標の具体的な測定方法は公知である。なお、トキシン活性の比較をこれらの指標に限定するものではないが、減毒化前後のトキシン活性の比較は同じ指標に基づいて行うべきであることは言うまでも無い。

（細菌トキシン）

コレラトキシン、病原性大腸菌易熱性トキシン

ADP-リボシル化酵素活性

cAMPの蓄積

Y-1細胞の変形

マウスの体重減少

CHO細胞の伸長

百日せきトキシン

ADP-リボシル化酵素活性

CHO細胞の伸長

白血球増多活性

ヒスタミン増感活性

マウスの体重減少

CHO細胞の伸長

ジフテリアトキシン

ADP-リボシル化酵素活性

モルモットの生存

ウサギ皮膚感作活性

破傷風トキシン

ADP-リボシル化酵素活性

モルモットの死亡

ウサギ皮膚感作活性

ブドウ球菌 $\alpha$ トキシン、ブドウ球菌 $\beta$ トキシン

溶血活性

シガトキシン

溶血活性

緑膿菌エンテロトキシンA

ADP-リボシル化酵素活性

腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシン

ADP-リボシル化酵素活性

溶血活性

(真菌トキシン)

カンジトキシン、フミガトキシン、

マウス死亡活性

(動物トキシン)

蛇毒

コリンエステラーゼ活性

コリンエステラーゼ阻害活性

ホスホリパーゼA2活性

血液凝固活性

血小板凝集活性

抗補体活性

蜂毒

N-アセチルグルコサミニダーゼ活性

## ヒアルロニダーゼ活性

## 【0052】

トキシン活性の測定にあたっては、ある測定方法で残存トキシン活性が認められなくても、別の方法では異なった結果となるケースもある。例えば、減毒化コレラトキシンの残存活性をADP-リボシル化酵素活性で測定した結果で実質的にゼロであっても、Y-1細胞形態変化法ではトキシン活性を検出した例がある（例えばK. Komase et al., Vaccine 16, 248-254, 1998）。また、大腸菌易熱トキシンのN末端から7番目をリジン残基に置換した組み換え変異体では、ADP-リボシル化酵素活性は実質的にゼロであったが下痢惹起性を認めた例がある。すなわち、大腸菌易熱トキシンのトキシン活性はADP-リボシル化酵素活性で代表されるが、別の機構による小さな第二のトキシン活性があり、組み換え変異体において第一の活性が著しく低くなった後には、第二のトキシン活性が相対的に大きくなるので検出されるようになると考えられる。一般的に、生細胞や生体を用いる測定方法ではトキシン活性がより鋭敏に検出される傾向がある。この背景には、上記の機構があると推定される。したがって、トキシン活性の比較は生細胞や生体の応答に基づいた鋭敏な方法で行うのが一般的にはより確実である。また残存トキシン活性は複数の測定方法により評価することが望ましい。本出願の実施例では、コレラトキシンの残存トキシン活性を、受容体結合活性法、Y-1細胞形態変化法、マウス足腫脹法、およびマウス腹腔内投与法などを併用して評価した。また抗トキシン抗体を利用する酵素免疫測定法（ELISA）も、トキシン活性の指標として有用である。いずれにせよ、原則としてそのトキシンの活性を鋭敏に反映する指標に基づいて、1/2000以下のトキシン活性となるように処理することが重要である。

## 【0053】

上記減毒化トキシンに保存剤や安定剤、あるいは更に公知のアジュバントを組み合わせて本発明によるアジュバントが構成される。アジュバントの安全性は、一般に繰り返し測定することによって判定される。また安全性の評価にあたっては、その指標の一つに生物細胞や生体を用いる測定方法を採用することが望ましい。これらの方法に加えて、実験動物に投与して急性毒性を調べるような一般的

な安全性試験法を併用する事は言うまでも無い。また経口投与、経鼻投与における安全性の指標として皮膚刺激性や粘膜刺激性に問題のない事を確認することも重要である。

#### 【0054】

##### アジュバント活性

本発明においては、減毒化処理によってトキシン活性を1/2000以下とする一方で、アジュバント活性を保持した減毒化トキシンをアジュバントとして利用する。前記〔1〕において規定した保持すべき3種のアミノ酸残基を備えたトキシンを利用すれば、アジュバント効果を高く維持できる可能性が高い。しかし、トキシン活性の低下のための処理を通じて、アジュバント活性が低下していないかどうかは、常に確認する必要がある。アジュバント活性は、活性を比較すべき物質を免疫抗原とともに動物に免疫し、免疫抗原に対する抗体価の上昇を観察することによって確認することができる。免疫動物の系統や免疫抗原などの条件を統一して比較すれば、アジュバント活性を比較することができる。

#### 【0055】

##### 使用形態

本発明の減毒化トキシンをワクチンの有効成分として用いる使用形態は特に限定されない。すなわち、公知の種々の適切な使用形態に適用することができる。すなわち、たとえば物理的混合や抗原蛋白との化学的結合物とすることができる。また、リポソームなどのキャリアーにワクチンとともに内包させることも可能である。

#### 【0056】

本発明の減毒化トキシンは公知のアジュバントの1つ以上と同時に使用することができる。実施例5には本発明の減毒化コレラトキシンと公知のアジュバントの一つ大腸菌易熱性トキシン Bサブユニットとの混合使用の例を示した。減毒化トキシンアジュバントは大腸菌易熱トキシン Bサブユニットとの混合使用においても粘膜免疫活性を誘発し、しかも、相乗効果が認められた。当業者ならば公知の方法を用いる試行実験により、好適な組み合わせを見い出すことができる。その結果、抗原の量を低下させたり、もう一方のアジュバントの量を低下させ、望

ましくない副反応を低下させ、望ましい免疫反応を増強することができる。

【0057】

### ワクチン

本発明によるアジュバントに基づいて、新規なワクチン製剤が提供される。本発明のワクチン製剤は、狭義及び広義の意味を含む。すなわち、1) ヒト及び動物に感染するウイルス、細菌、真菌、原虫、その他の微生物に有効な狭義のワクチンを含む。その一部を例示すれば、インフルエンザワクチン、百日せきワクチン、精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン、日本脳炎ワクチン、A型肝炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、ロタワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん風しんおたふくかぜ三種混合ワクチン、麻しん風しん二種混合ワクチン及びヘモフィルスインフルエンザワクチン等の各種ワクチンが挙げられる。さらには、結核ワクチン、多剤耐性黄色ブドウ状球菌(MRSA)ワクチン、ヘリコバクター・ピロリワクチン、出血性大腸菌(EHEC)ワクチン、サルモネラワクチン、クラミジアワクチン、マイコプラズマワクチン、エイズワクチン、マラリアワクチン、コクシジウムワクチン、あるいは住血吸虫ワクチンを含む。2) さらに広義のワクチンとして、がんワクチン、不妊ワクチン、胃潰瘍ワクチン、糖尿病ワクチン及び動脈硬化症ワクチンなど非感染症の予防や治療に有効なワクチンを含む。

【0058】

これらのワクチンは製造方法により分類される種々のワクチンを含む。すなわち、弱毒化生ワクチン、不活化ワクチン、コンポーネントワクチン、DNAに基づくワクチンなどを含む。DNAに基づくワクチンの中には、プラスミドなどのキャリアに組み込んだDNA断片を含むワクチンのほか、リボザイムやアンチセンスオリゴヌクレオチドなどを併用するワクチンが含まれる。これらのワクチンは、治療用でも予防用でも良い。また、ワクチンの効果にとって有効な抗原成分を遺伝子操作技術を応用して組み換え生物細胞に生産させたものを用いる組み換えワクチンも含まれる。これらのワクチンは単味ワクチンでも混合ワクチンでも良い。これらのワクチンの製造方法や使用形態を例示すれば次の通りである。

【0059】

- ・インフルエンザワクチン；発育鶏卵、または、ペロ細胞など動物細胞培養技術により増殖させたウイルスをエーテル、界面活性化剤などで分解精製して得た、あるいは遺伝子操作や化学合成によって得た赤血球凝集素（HA）、ノイラミニダーゼ（NA）、核蛋白質（NP）、マトリックス蛋白質（M）あるいはその一部などを含むスプリットワクチン。または、これらの蛋白質の遺伝子を含むDNA断片をふくむ経鼻接種用DNA ワクチン。
- ・百日せきワクチン；百日せき菌を培養した培養液あるいは菌体より塩析、超遠心分離などを用いて抽出し、ホルマリンで無毒化した不活化ワクチン、または、遺伝子操作や化学合成によって得た百日せき菌毒素（PT）、赤血球凝集素（FHA）、69K膜タンパク質、あるいは、その一部などを含む組み換えワクチン。
- ・百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン；百日せきワクチンにジフテリアトキシソイドおよび破傷風トキシソイドを混合した注射用三種混合ワクチン。
- ・日本脳炎ワクチン；マウス脳内で増殖したウイルス、またはペロ細胞など動物細胞培養技術により増殖したウイルスを超遠心分離あるいはエチルアルコールなどを用いてウイルス粒子を精製した後、ホルマリンで不活性化したもの、あるいは遺伝子操作や化学合成などによって得た抗原蛋白質を含むワクチン。
- ・B型肝炎ワクチン；B型肝炎キャリアの血液を原材料とし、塩析、超遠心分離を用いてHBs抗原を分離精製したプラズマワクチン、あるいは遺伝子操作や化学合成などによって得た抗原部位などを含む組み換えワクチン。
- ・麻疹ワクチン；ニワトリ胎児細胞などの培養細胞、あるいは、発育鶏卵で増殖させた弱毒ウイルス生ワクチン、あるいは、ウイルスの一部、または、遺伝子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含む組み換えワクチン。
- ・風しんワクチン；ニワトリ胎児細胞などの培養細胞、あるいは、発育鶏卵で増殖させたウイルス、あるいは、その一部、または、遺伝子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。
- ・おたふくかぜワクチン；家兎細胞などの培養細胞あるいは発育鶏卵で増殖させたウイルス、または、その一部、あるいは、遺伝子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含む弱毒生ワクチン。

【0060】

- ・麻しん風しんおたふくかぜ混合ワクチン；麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチンを混合した三種混合ワクチン。
- ・麻しん風しん混合ワクチン；麻しんワクチン、風しんワクチンを混合した二種混合ワクチン。
- ・ロタワクチン；MA104細胞など培養細胞で増殖させたウイルス、または患者の糞便中より得たウイルス、または、その一部、あるいは遺伝子操作や化学合成により得た感染防御抗原を含むワクチン。
- ・マイコプラズマワクチン；マイコプラズマ増殖用培地で増殖したマイコプラズマ、または、その一部、あるいは、遺伝子操作や化学合成などにより得られた感染防御抗原を含むワクチン。
- ・エイズワクチン；培養細胞で増殖させたウイルスまたは患者より得たウイルス、または、その一部、あるいは遺伝子操作や化学合成により得た感染防御抗原を含むワクチン、あるいは有効なDNA断片を含むDNA ワクチン。
- ・H.ピロリワクチン；培養したH.ピロリ菌体の破砕物、または、H.ピロリ培養物から分離したウレアーゼ、熱ショック蛋白質、毒素などを抗原とするワクチン、あるいは、遺伝子組み換え技術により生産されたこれらの抗原蛋白質からなる注射用あるいは経口、経鼻接種用ワクチン。

#### 【0061】

##### ワクチンの性状

上記ワクチンは液状または粉末状で提供される。

これらワクチンは本発明の減毒化トキシンと共に投与されるときは液状の方が鼻腔内投与（鼻腔内スプレー、滴下、塗布など）や注射の場合に適している場合が多い。更に鼻腔内投与の場合は、粉末スプレー方式も可能である。また、本発明によるワクチン製剤には、公知の安定剤や防腐剤を配合する事ができる。安定剤としては、0.2%程度のゲラチンやデキストラン、0.1-1.0%のグルタミン酸ナトリウム、あるいは約5%の乳糖や約2%のソルビトールなどが用いられる。防腐剤としては、0.01%程度のチメロサルや0.1%程度のベータプロピノラクトンなどが公知である。

#### 【0062】



減毒化トキシンの混合比率

本発明によるワクチンにおける抗原と減毒化トキシンの混合比率として、1:0.0001~1:10000（重量比）を例示できる。この範囲は一般的な範囲であり、ワクチンの種類に応じて好適な比率を決定して用いる。その為に必要な方法は、当業者に公知である。実施例に示した天然トキシンの減毒化体を含む本発明によるアジュバントは、天然体と同じ使用量で同レベルの免疫増強活性を示す。一方、公知の組み換え変異体では、天然トキシンと同レベルの免疫増強活性を達成するためにより多くの接種が必要となることが多い。

## 【0063】

減毒化トキシンの混合法

本発明のワクチン製剤は、上記ワクチンに本発明の減毒化トキシンアジュバントを所定の量比で混合することにより調製される。調製は厳密に無菌的に行なうべきである。それぞれの原材料も無菌的に調製される。ワクチン作用以外に必要なパイロジェンやアレルゲンとなるような夾雑蛋白質は可能な限り除去しておくことが望まれる。当業者にとって、その為に必要な方法は公知である。本発明のワクチン製剤は、ワクチン抗原と本発明の減毒化トキシンをそれぞれ別々に調製、製剤化しておき、用時に混合してから接種するか、または、別々に、ほぼ同時に投与するという方法によっても、効果を発揮させることができる。

## 【0064】

ワクチン接種法

本発明によるワクチンの使用方法是公知のどの方法も使用できる。接種量はマウスの場合、鼻腔内で5 $\mu$ L~50 $\mu$ L、ヒトの場合は鼻腔内投与、注射いずれの場合も0.1~1.0mLが好適である。これらの量は適宜変更し得る。また、次に例示するワクチンは、効果の点で、あるいは、接種操作の点で、経口接種あるいは経鼻接種が強く要望されている。インフルエンザワクチン、百日せきワクチン、ジフテリアワクチン、ロタワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、ヘリコバクター・ピロリワクチン、出血性大腸菌（EHEC）ワクチン、クラミジアワクチン、マイコプラズマワクチン、コクシジウムワクチン、エイズワクチン、マラリアワクチン、および住血吸虫ワクチン。

## 【0065】

これらのワクチンは、単独で接種される場合もあるし、百日せき・ジフテリア・破傷風三種混合ワクチン、あるいは、麻疹・風疹・二種混合ワクチンのように、複数のワクチンを混合して、同時に接種する方法を採用することもできる。経口接種や経鼻接種が望まれる理由は、一つは、気道や消化管の粘膜が感染初期の重要な部位であるためである。適切な免疫増強活性の強いアジュバントを含むワクチンの接種により、局所粘膜における免疫機構を誘発し、できるだけ感染初期に防御効果を発揮させることが可能になる。あるいは、マラリアワクチンのように、必ずしも十分な医療施設の期待できない地域で使用される機会が多いことが予想されるワクチンについては、医師や看護婦など専門の医療技術者の助けが無くても接種が可能な接種方法として、経口接種、経鼻接種などが望まれるからである。以下本発明の実施例を示すが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

## 【0066】

## 【実施例】

実施例1 コレラトキシンの調製

コレラトキシンはFinkelsteinらの方法 (R. A. Finkelstein et al. J. Infect. Dis., 121, Suppl., S63, 1970) に準じて製造した。

トキシン生産性コレラ菌 (*Vibrio cholerae* 稲葉型569B株) をFinkelsteinらの半合成カザミノ酸培地 (グルコース添加液体培地) で30℃、20時間培養した。培養後、培養上清をコレラトキシン分子 (分子量8.6万) の通過する限外濾過膜を通過させた。通過液に少量の水酸化アルミニウムゲルを加えてトキシンを吸着させ、遠心により集めた。30-35℃に加温しながら、10%リン酸-10%クエン酸塩 (pH 7.6) で溶出し、溶出液を0.1Mクエン酸塩水溶液に対して透析した。その後、DEAE-セファデックスのカラムに通塔し、0.1-0.2M食塩水添加リン酸緩衝液 (以下PBSと省略する) で溶出した。次にセファデックスG-75のカラムに通塔し、PBSで溶出した。得られた試料をゲル電気泳動法により調べた結果、コレラトキシンだけの染色帯が観察された。純度は約95%であった。収量は培養液 100L から250mgであった。

【0067】

実施例2 コレラトキシンの減毒化

実施例1で得た精製コレラトキシンを0.01M生理食塩水添加PBS(pH7~8)に溶解した。ここに0.05Mのリジンを加え、その後、終濃度で0.1、0.3、0.5、0.6、0.8、および1.0%となるように、ホルマリンを滴下し、30-40℃でそれぞれ7-96日間保温した。保温の途中で試料を採取し、採取した試料をただちに20倍量のPBSに対して透析し、ホルマリンを除去した。その後、濾過除菌し、減毒化コレラトキシンを得た。途中採取した試料の一部を用い、途中経過を確認した。一例として、ホルマリン処理12日目の試料について、コレラトキシン B サブユニットの受容体であるガングリオシドGM1への結合能（トキシンの標的細胞に対する結合機能を持つサブユニット、トキシン活性はAサブユニットによりもたらされている）を測定する方法により残存トキシン活性を測定した結果を図1に示す。この結果から、0.3%、または0.5%のホルマリンで12日間処理したばあい、ガングリオシドGM1への結合能はそれぞれ、天然体の約1/15、1/100に低下することがわかる。

【0068】

種々の条件で減毒化処理を行った各種試料の残存トキシン活性をY-1細胞形態変化法で測定した。その結果の一例を表1に示す。この結果から、0.3%および0.5%ホルマリンで12~96日間処理した場合、残存トキシン活性は1/1780~1/114000に低下することが分かる。上記のように調製した減毒化コレラトキシを用い、マウスにおける急性毒性を調べた。表2に記載の残存トキシン活性が1/7000以下の減毒化コレラトキシンは、いずれも30 mg/kgの腹腔内投与において毒性の兆候は認められなかった。したがって、35℃、0.3%ホルマリン処理であれば、12日以上処理でトキシン活性1/2000以下（マウス急性毒性を指標とする）とすることができる。

【0069】

【表2】

ホルマリン処理コレラトキシンの残存トキシン活性  
（Y-1細胞形態変化法で測定した結果による）

ホルマリン処理		残存毒性 (ED50)		減毒率
濃度 (%)	処理 日数	希釈 (4 <sup>n</sup> )	(4 <sup>n</sup> )	減毒倍率概数
0.3	12	2.0 ± 0.6	6.7	10,800
	24	2.3 ± 0.6	6.4	7,130
	48	2.7 ± 0.6	6.0	4,100
	72	3.3 ± 0.6	5.4	1,780
	96	3.3 ± 0.6	5.4	1,780
0.5	12	0.3 ± 0.6	8.4	114,000
	24	0.7 ± 0.6	8.4	65,500
	48	1.3 ± 0.6	7.4	28,500
	72	1.3 ± 0.6	7.4	28,500
	96	0.7 ± 0.6	8.0	65,500
未処理対照		8.7 ± 0.6		1

# 【0070】

## 実施例3 インフルエンザHAワクチンに対する二次抗体産生増強作用

マウスに馴化したインフルエンザウイルスPR8株 (A/プエルトリコ/8/34、H1N1型) から調製したHA抗原をワクチン用の抗原として用いた。アジュバントには減毒化コレラトキシンを用いた。用いた減毒化コレラトキシンの残存トキシン活性は、1/1780~1/114000 (Y-1細胞形態法による) であった。BALB/Cマウス (6週令、雌) を一群5匹で試験に用いた。マウスをアモバルビタールナトリウムを腹腔内投与して麻酔した。1 $\mu$ g のワクチン抗原と1 $\mu$ gのアジュバントを含むように調製した生理的食塩水添加PBS10 $\mu$ Lをマウスの片方の鼻孔より滴下し、経鼻免疫した。4週間後さらに同じ条件で二次免疫した。二次免疫の2週間後、マウスの血清と鼻腔洗液を採取した。

# 【0071】

血清中の抗インフルエンザウイルス抗体価はHI抗体価により測定した。鼻腔洗液は、放血後のマウスの左右の鼻腔より1mLの0.1%牛血清アルブミン (BSA) を含むPBSを灌流することによって回収した。鼻腔洗浄液中のHA-IgA抗体量、および

血清中の抗HA-IgG抗体量は酵素免疫測定法 (ELISA) によって測定した。抗HA-IgAの定量の際には、コーティング緩衝液に懸濁したHAワクチン ( $5 \mu\text{g/mL}$ )  $50 \mu\text{L}$  でまずEIAプレートの各ウェルをコーティングした。室温に2時間放置後、ツィーン20添加PBS (以下PBS-ツィーンと記す) でプレートを洗浄した。次に、非特異反応を抑制するために、1% BSAおよび0.1%  $\text{NaN}_3$ を含むPBS、 $100 \mu\text{L}$ で各ウェルをコートした。4℃に一昼夜放置後、PBS-ツィーンで洗浄した。このウェルに適当に希釈した鼻腔洗浄液試料 $100 \mu\text{L}$ を分注し、数時間後に反応液を除去してPBS-ツィーンで洗浄した。次に各ウェルに $100 \mu\text{L}$ の1%BSAおよび0.1%  $\text{NaN}_3$ を含むPBSで希釈したアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgA  $\alpha$ 鎖特異抗体 (またはアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体) を分注した。室温に1時間放置後に洗浄した。最後に、各ウェルに10%ジエタノールアミン緩衝液 (pH 9.8) に溶解したp-ニトロフェニルリン酸 ( $1 \text{ mg/mL}$ ; シグマ社製) を加えて発色させた。室温で20~30分放置後、発色をプレートリーダーを使ってOD (405 nm) で測定した。

#### 【0072】

図2は実施例2で調製した減毒化コレラトキシンをアジュバントに用いたインフルエンザワクチンの、二次応答による鼻腔洗液中の抗インフルエンザHA IgA抗体産生に対する影響を示したものである。アジュバント無添加ワクチンを鼻腔内接種したときには、抗HA-IgA抗体の力価は低かった。これに対し、減毒化コレラトキシン添加ワクチンで一次、二次接種したグループでは鼻腔洗液中の抗HA-IgA抗体価の著しい上昇が観察された。その抗体価は対照として用いた同用量の天然体コレラトキシンの場合と同等であった。

#### 【0073】

図3は上記試験における、血清中抗HA IgG抗体産生に対する影響を示したものである。減毒化トキシンは血清中のHA抗体価をアジュバント無添加の場合よりも15倍程度上昇させた。しかし、抗体価は対照として用いた天然体コレラトキシンの場合の半分程度であった。これらの結果から、減毒化コレラトキシンは、例えば局所免疫増強を必要とするワクチンのアジュバントとして有用であることがわかる。

【0074】

実施例4 高度減毒化トキシンのアジュバント活性

アジュバントとして残存トキシン活性が天然体の1/2000以下の種々異なる減毒化コレラトキシンの用いた。実施例2と同様の試験を複数回実施し、マウス鼻腔洗液中の抗HA-IgAおよび血中IgG抗体価を測定した。試験毎の抗体価を、陽性対照として用いた同用量の天然体コレラトキシンの場合の抗体価に対する相対値に換算した。この相対値を縦軸に、用いた減毒化トキシンの減毒化率（天然体に対する相対残存活性）を横軸にグラフ化した（図4）。残存トキシン活性が天然体の1/2000以下（ $1/2000 \div 4^{-5.46}$ ）の多くの減毒化トキシンが、同用量の天然体コレラトキシンの匹敵する高い抗体産生増強作用を示す事が明らかである。特に経鼻接種による抗原特異的粘膜IgAの増強に対して、1/2000以下の残存トキシン活性を持つもので減毒化前のトキシンと同等、あるいはそれ以上の有効性を示すことが確認された。

【0075】

実施例5 二つのアジュバントの併用

アジュバントとしてホルマリン処理で減毒化したコレラトキシン（Y-1細胞形態変化法による残存トキシン活性1/1048000）およびトキシン活性の弱いことが既に確立されている大腸菌易熱トキシンBサブユニット（未処理）を同時に使用した。実施例3と同様に実施し、インフルエンザウイルスに対する細胞性免疫応答を、マウス足腫脹法で測定した。結果は図5に示すとおりであった。大腸菌易熱トキシンBサブユニット1 $\mu$ gと減毒化コレラトキシンを0.1 $\mu$ g、0.01 $\mu$ gを同時に使用する条件下では、同量の減毒化コレラトキシンを単独使用した時より、免疫応答は明らかに増強された。この結果は、減毒化トキシンと別のアジュバントを同時に使用する方法により、減毒化トキシンの使用量をさらに低く抑えられることを示す。

【0076】

実施例6 各種減毒化トキシンの調製と抗体産生増強作用

北里研究所製ジフテリアワクチンと百日せきワクチンを製造する方法（北里研究所編著・発行、「ワクチン製造技術教本」,1986）に準じ、それぞれ、ジフテ

リアトキシンと百日せきトキシンを調製した。実施例2と同じ方法で減毒化したこれらのトキシンをアルミニウムゲルに吸着させて実験に使用した。また、市販のブドウ球菌 $\alpha$ トキシン（シグマ社製）、腸炎ビブリオ耐熱トキシン（シグマ社製）を購入し、実施例2と同じ方法で減毒化してそのまま用いた。大腸菌易熱トキシンの組み換え変異体LTR(7)K（N末端から7番目のアルギニン残基をリジン残基に置換したもの）は、Komaseらの方法（K.Komase et al., Vaccine 16, 248-254, 1998）で調製した。こうして5種類の減毒化トキシンを得た。実施例3における減毒化コレラトキシンの代わりに、上記のように調製した減毒化トキシンを適当な濃度で用いる以外は実施例3の操作に従ってインフルエンザワクチンにおける免疫増強効果を調べた。表3には減毒化トキシンの残存トキシン活性の相対値（天然体に対する減毒化率）とともに、その結果を示す。

この結果から、天然トキシン、組み換え変異体トキシンのいずれでも、本発明を構成するアジュバントは経鼻接種ルートで投与されたインフルエンザワクチンに対し、免疫増強活性があることがわかる。

【0077】

【表3】

各種減毒化トキシンの抗体産生増強作用

減毒化した トキシン の種類	減毒化率 (1/4 <sup>n</sup> )	接種量 (μg /マウス)		抗体産生 HI (2 <sup>n</sup> )
		トキシン	インフルエ ンザ HA	
ブドウ球菌αトキシン	6.7	0.5	2.0	9.0
	9.1	0.5	2.0	8.6
百日せきトキシン	7.9	1.0	2.0	11.0
	9.3	1.0	2.0	10.8
ジフテリアトキシン	7.2	1.0	2.0	10.5
組み換え大腸菌易熱性 トキシン (LT-R7K)	5.8	5.0	2.0	10.9
	9.3	5.0	2.0	11.8
腸炎ビブリオ菌 耐熱トキシン	8.4	0.5	2.0	9.0
コレラトキシン (対照)	0.0	1.0	2.0	11.2
無添加 (対照)		0.0	2.0	< 4

【0078】

実施例7 百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン-減毒化コレラトキシン製剤  
(点鼻剤) :

百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンと、PBSに溶解し濾過滅菌した減毒化コレラトキシン（天然体と比較したトキシン活性は約1/100000）を混合し、20μL中に混合ワクチンが蛋白質窒素として50μgと減毒化コレラトキシン5μgを含むように調製した。これに防腐剤（0.005%チメロサル）を加え、適当な容器に適量分注して、百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン-減毒化コレラトキシン経鼻投与剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存した。

上記のように調製した百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンおよび減毒化トキシンを含むワクチンを各群のマウスに接種し、さらに、4週間後に同量のワクチンを追加接種し、その2週間後の抗体産生を調べた。抗百日せきトキシン抗体



、抗ジフテリアトキシン抗体、抗破傷風トキシン抗体の力価（国際単位）は、ワクチンのみを接種されたマウスにおいてはそれぞれ、2.0単位以下、2.0単位以下、ならびに1.5単位以下であった。一方、減毒化トキシンを含むワクチン接種群では、それぞれ、88.6、61.8、そして75.5単位であった。試験成績から、アジュバント無添加ワクチンを接種されたマウスに比べ、減毒化トキシンを含むワクチン接種群では、いずれの抗原に対しても、抗体産生量が高いことがわかる。

## 【0079】

実施例8 B型肝炎ワクチン-減毒化コレラトキシン（注射剤）：

B型肝炎ワクチンと、PBSに溶解し濾過滅菌した減毒化コレラトキシン（天然体と比較したトキシン活性は $1/10^6$ 以下）を含む画分を混合し、1mL中にHBs抗原が蛋白質として40 $\mu$ gと、減毒化コレラトキシン10 $\mu$ gを含むように調製した。これに防腐剤（0.01%チメロサル）および安定剤（0.2%豚由来ゲラチン）を加え、適当な容器に適量分注して、B型肝炎ワクチン-減毒化コレラトキシン注射剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存した。

## 【0080】

上記のように調製したB型肝炎ワクチンをマウスに接種し、3週間後の血中の抗体産生を調べた。その結果、アジュバント無添加ワクチンを接種されたマウスでは、受身赤血球凝集反応で、 $2^{3.6}$ 単位であったのに対し、減毒化コレラトキシンを添加したものでは $2^{5.8}$ 単位であった。

## 【0081】

実施例9 日本脳炎ワクチン-減毒化コレラトキシン製剤（注射剤）：

日本脳炎ワクチンと、PBSに溶解し濾過滅菌した減毒化コレラトキシン（天然体と比較したトキシン活性は $1/100000$ 以下）を混合し、1 mL中に $10^{7.0}$ PFU相当量の不活化日本脳炎ウイルス粒子と、減毒化コレラトキシン2 $\mu$ gを含むように調製した。これに安定剤（0.2%豚製ゲラチン）を加え、適当な容器に適量分注して、日本脳炎ワクチン-減毒化コレラトキシン注射剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存した。

## 【0082】

上記のように調製した日本脳炎ワクチン1週間隔で2回マウスに接種し、血中の

抗体価を測定した。アジュバント無添加ワクチンを接種した場合に産生される中和抗体価は $10^{1.8}$ であったのに対し、減毒化コレラトキシンを添加したものでは $10^{2.9}$ であった。

## 【0083】

実施例 10 麻しん風しん混合ワクチン-減毒化コレラトキシン製剤（点鼻剤）

：

麻しん風しん混合ワクチンと、PBSに溶解し濾過滅菌した減毒化コレラトキシン（天然体と比較した残存トキシン活性は約 $1/28500$ ）を混合し、 $20\mu\text{L}$ 中に各ワクチン  $7\mu\text{g}$  相当量のウイルス粒子と、減毒化コレラトキシンを $2.5\mu\text{g}$ 含むように調製した。これに安定剤（0.2%豚製ゲラチン、0.1%グルタミン酸ナトリウム、5%乳糖）を加え、適当な容器に適量分注して、麻しん風しん混合ワクチン-減毒化コレラトキシン点鼻剤とした。本品は $10^{\circ}\text{C}$ 以下の冷暗所に保存した。

## 【0084】

上記のように調製した麻しん風しん混合ワクチンを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生を測定した。その結果、アジュバント無添加ワクチンを投与した場合に産生される麻しん、風しんのELISA抗体価は、それぞれは、0.18、0.08であったのに対し、減毒化コレラトキシン添加ワクチンは、各々0.34、0.42であった。

## 【0085】

実施例 11 麻しん風しん混合ワクチン-減毒化百日せきトキシン製剤（点鼻剤）：

実施例 9 における減毒化コレラトキシンの代わりに減毒化百日せきトキシン（実施例 6 で調製したもの、天然体と比較したトキシン活性/CHO細胞変形試験法は $1/100000$ 以下）を用いる以外は実施例 10 の操作に従ってマウスの血中抗体価を測定した。アジュバント無添加ワクチンを投与した場合に産生される麻しん、風しんのELISA抗体価は、それぞれ0.19、0.070であったのに対し、減毒化百日せきトキシン添加ワクチンは、0.32および0.16であった。

## 【0086】

実施例 12 ロタワクチン-減毒化組み換え大腸菌易熱トキシン製剤（経口、点

鼻剤）：

ロタワクチンと、PBSに溶解し濾過滅菌した減毒化組み換えLTR(7)K（天然体と比較したトキシン活性は約1/260000、実施例6と同じもの）を含む画分を混合し、20 $\mu$ L中にロタワクチン3.5 $\mu$ g相当量のウイルス粒子と、減毒化組み換えLTR(7)Kを10 $\mu$ g含むように調製した。これに防腐剤（0.01%チメロサル）および安定剤（0.2%豚由来ゲラチン）を加え、適当な容器に適量分注して、ロタワクチン-減毒化LTトキシン経口剤、および点鼻剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存した。

## 【0087】

上記のように調製したロタワクチンを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生力価を測定した。点鼻接種の場合、ワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は、0.072であったのに対し、減毒化LTトキシン添加ワクチン接種の場合は、0.40であった。また、経口接種の場合、アジュバント無添加ワクチンを投与した場合に産生されるELISA抗体価は、0.020であったのに対し、減毒化LTトキシン添加ワクチン接種の場合は、0.19であった。

## 【0088】

## 【発明の効果】

以上の実施例により次のことが明らかである。

1. 減毒化トキシンで構成される本発明のアジュバントは、共存するインフルエンザワクチン抗原などに対する抗体産生を増強する。
2. 本発明によるアジュバントとともにワクチン抗原を経鼻接種する場合、血中の抗体産生だけでなく局所の抗体産生も増強される。
3. 本発明のアジュバントは、残存トキシン活性が検出限界以下のレベルまで低下している場合にも、抗原と共存する場合、同じ使用量で天然体トキシンと同程度の免疫増強作用を示す。
4. 本発明のアジュバントと公知の他のアジュバントとを併用した場合、相乗的に抗体産生が増強される場合がある。換言すれば、本発明のアジュバントと適切な組み合わせのアジュバントと併用する方法により、ワクチン抗原の摂取量を減少させることができ、副反応の起きる可能性を低減させることができる。

【0089】

このように、本発明による減毒化トキシンを含むワクチン製剤は、安全性の高いアジュバントとして有用である。更に本発明のアジュバントを利用したワクチンは、安全性が高い上に経鼻接種、あるいは経口接種といった公知の方法では効果的な免疫を期待しにくい接種ルートであっても、十分な免疫増強活性を持った優れたワクチンとなる。加えて本発明に基づくワクチンは、実施例で示したように局所免疫や細胞性免疫の誘導能に優れるなど、公知のアジュバントでは達成が困難であった課題を解決するものである。加えて本発明は、天然体のトキシンでさえ安全なアジュバントとして利用することを可能とする。そのためトキシンの変異体を作り出すというアプローチに比べて、はるかに容易にワクチンへの応用を実現することができる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】減毒化コレラトキシンのガングリオシドGM1への結合能を示すグラフ。

コレラトキシンをホルマリン処理により減毒化し、本発明のアジュバントを製造する途中に実施した、減毒化確認試験例を示す。図中、縦軸は、受容体であるガングリオシドGM1への結合能（ELISAのOD/410 nm）を、横軸は、トキシン濃度（ng/mL）を示す。

【図2】二次応答による鼻腔粘膜における抗インフルエンザウイルス抗体産生に対する減毒化コレラトキシンの増強作用を示すグラフ。

本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを用いたものを経鼻接種した時の鼻腔洗液中の抗体価を示す。縦軸は種々の条件で処理した減毒化コレラトキシンを示し、横軸は鼻腔洗液中の抗HA IgA抗体濃度（ $\mu$ g/mL）を示す。

【図3】二次応答による血清中の抗インフルエンザウイルス抗体産生に対する減毒化コレラトキシンの増強作用を示すグラフ。

本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを用いたものを経鼻接種した時の血清中の抗体価を示す。縦軸は種々の条件で処理した減毒化コレラトキシンを示し、横軸は血清中の抗HA IgG抗体濃度（ $\mu$ g/mL）を示す。

【図4】減毒化トキシンの免疫増強活性を示すグラフ。

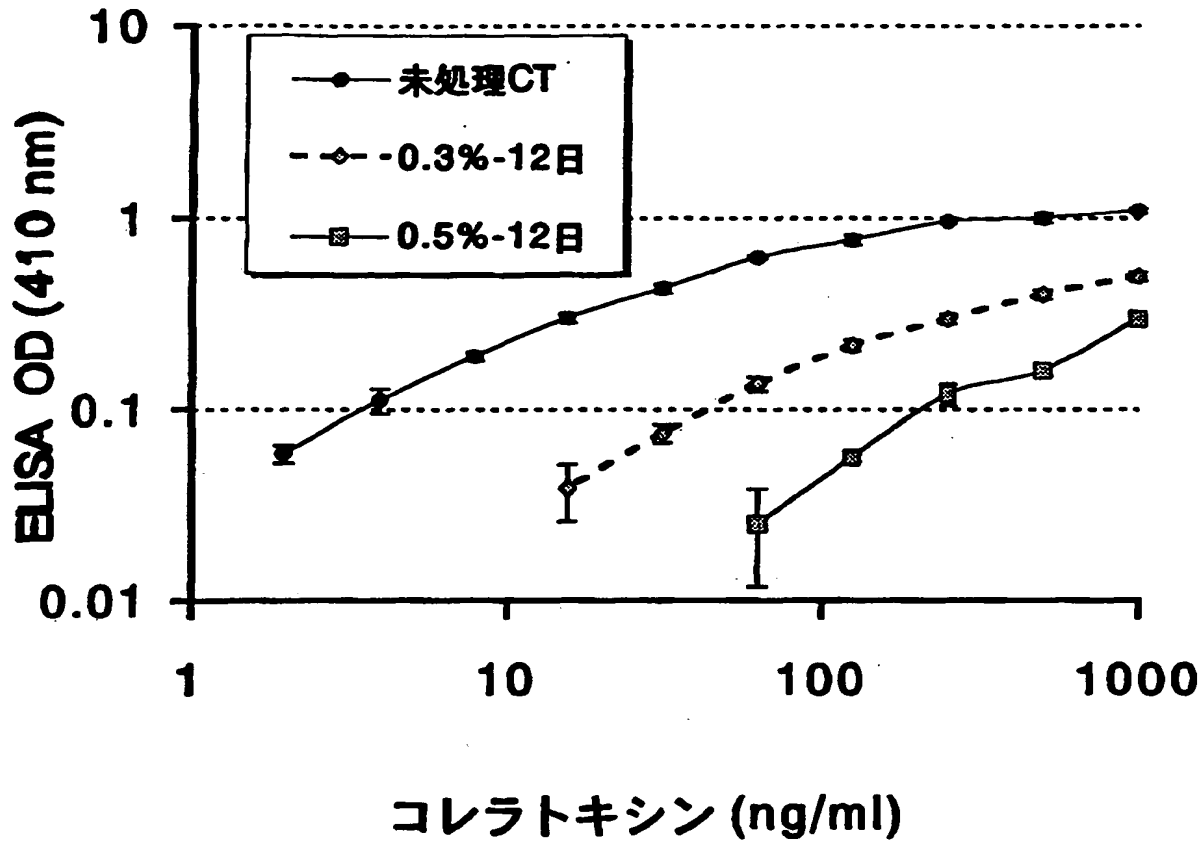
残存トキシン活性が異なるコレラトキシンをアジュバントとして含む本発明のインフルエンザワクチンを経鼻接種し、二次応答における鼻腔洗液中、または血清中の抗体価を示す。縦軸は、天然コレラトキシンを用いた対照区の抗HA IgA抗体価に対する、減毒化コレラトキシンを用いた試験区の鼻腔洗液中の抗HA IgA抗体価の相対値（■）および、天然コレラトキシンを用いた対照区の抗HA IgG抗体価に対する、減毒化コレラトキシンを用いた試験区の血清中の抗HA IgG抗体価の相対値（○）を示し、横軸は天然トキシンの活性に対する、試験に使用した減毒化コレラトキシンの残存トキシン活性の相対値（Y-1細胞形態変化法で測定）を示す。

【図5】二つのアジュバントの相乗効果を示すグラフ。

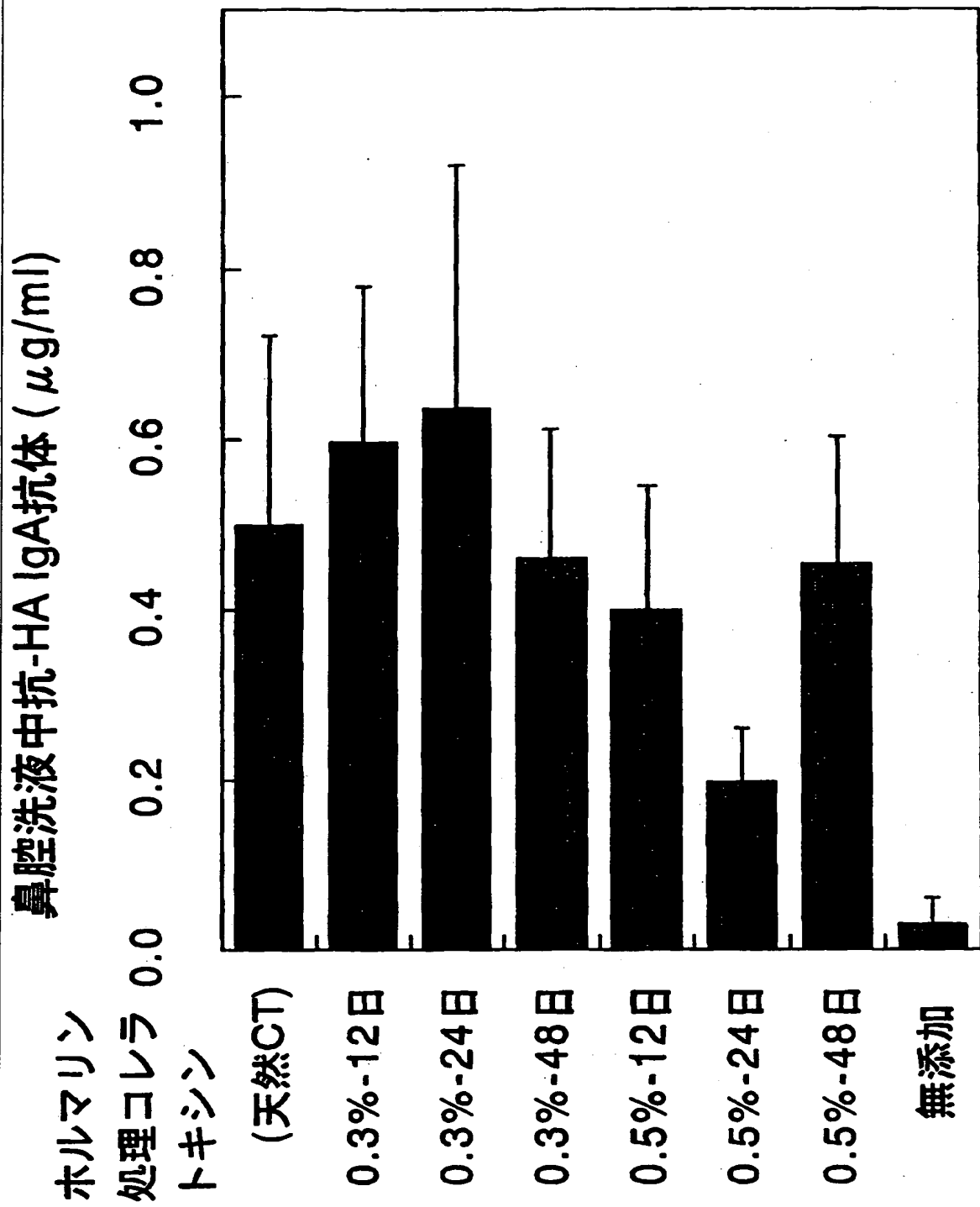
アジュバントとして、本発明の減毒化コレラトキシンおよび公知の大腸菌易熱トキシンBサブユニットを併用し、これらを含むインフルエンザワクチンを経鼻接種したときの免疫応答を示す。縦軸は試験に使用したアジュバントの種類と量を示し、横軸は免疫応答をマウス足腫脹法で測定した結果を示す。

【書類名】 図面

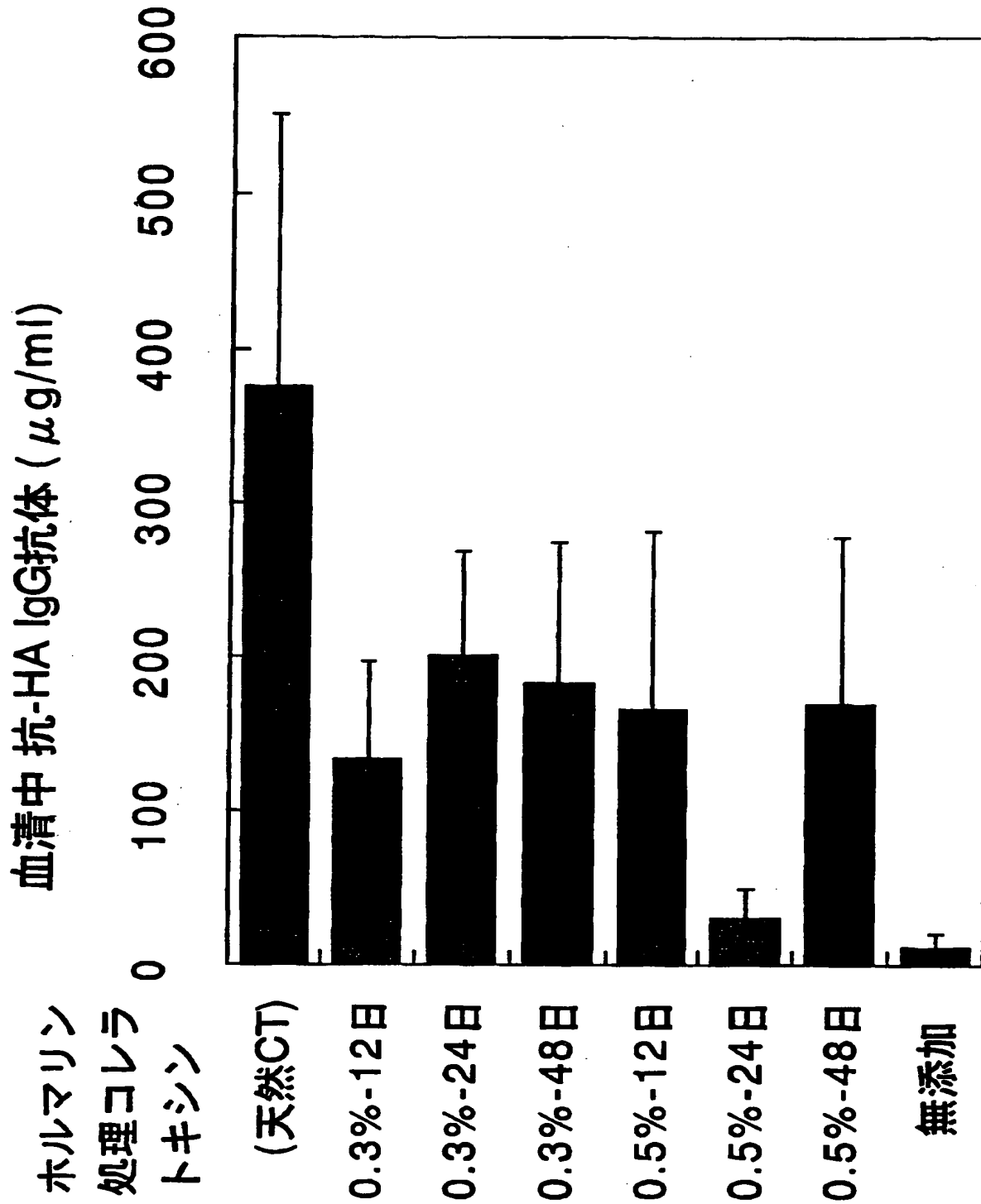
【図1】



【図2】

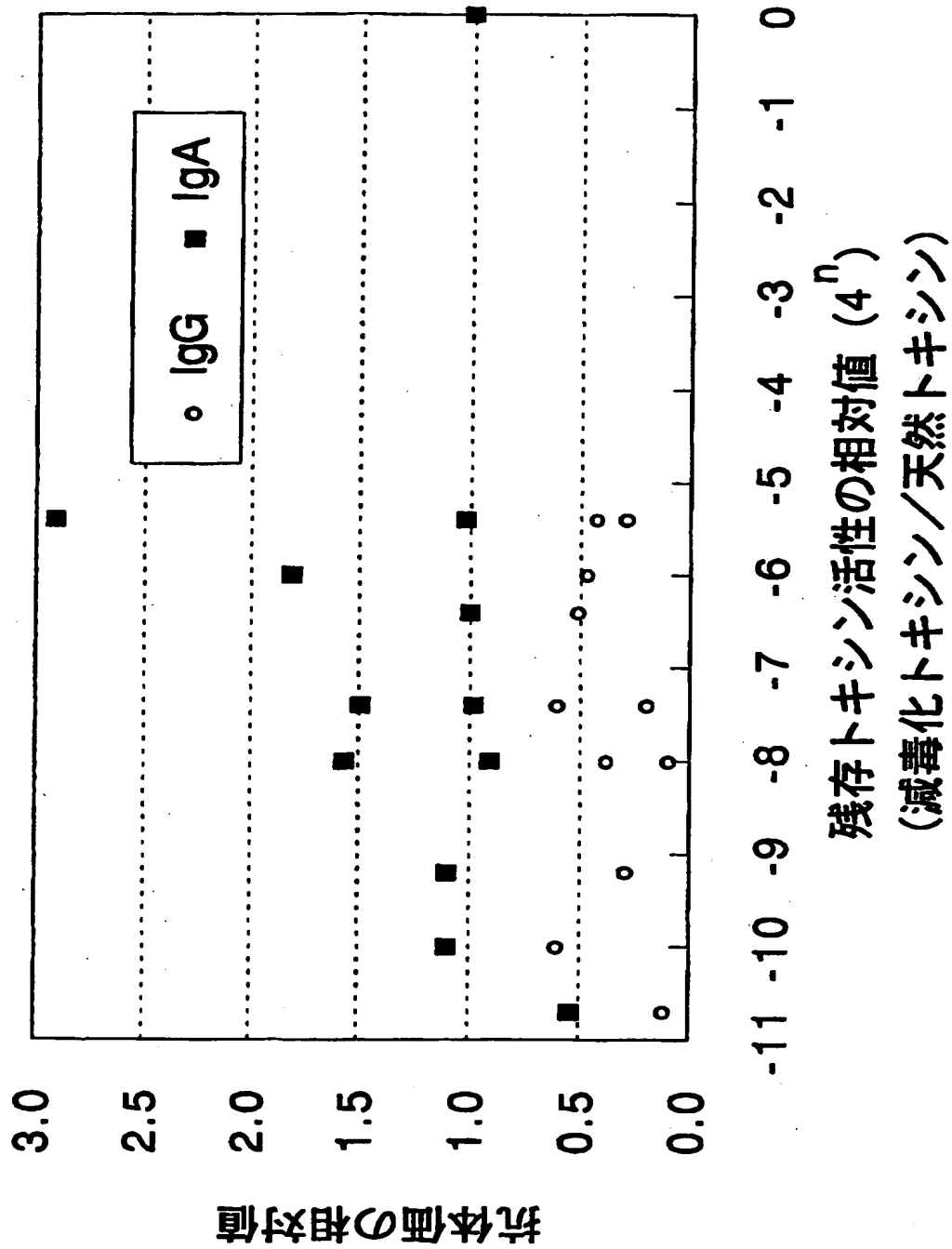


【図 3】



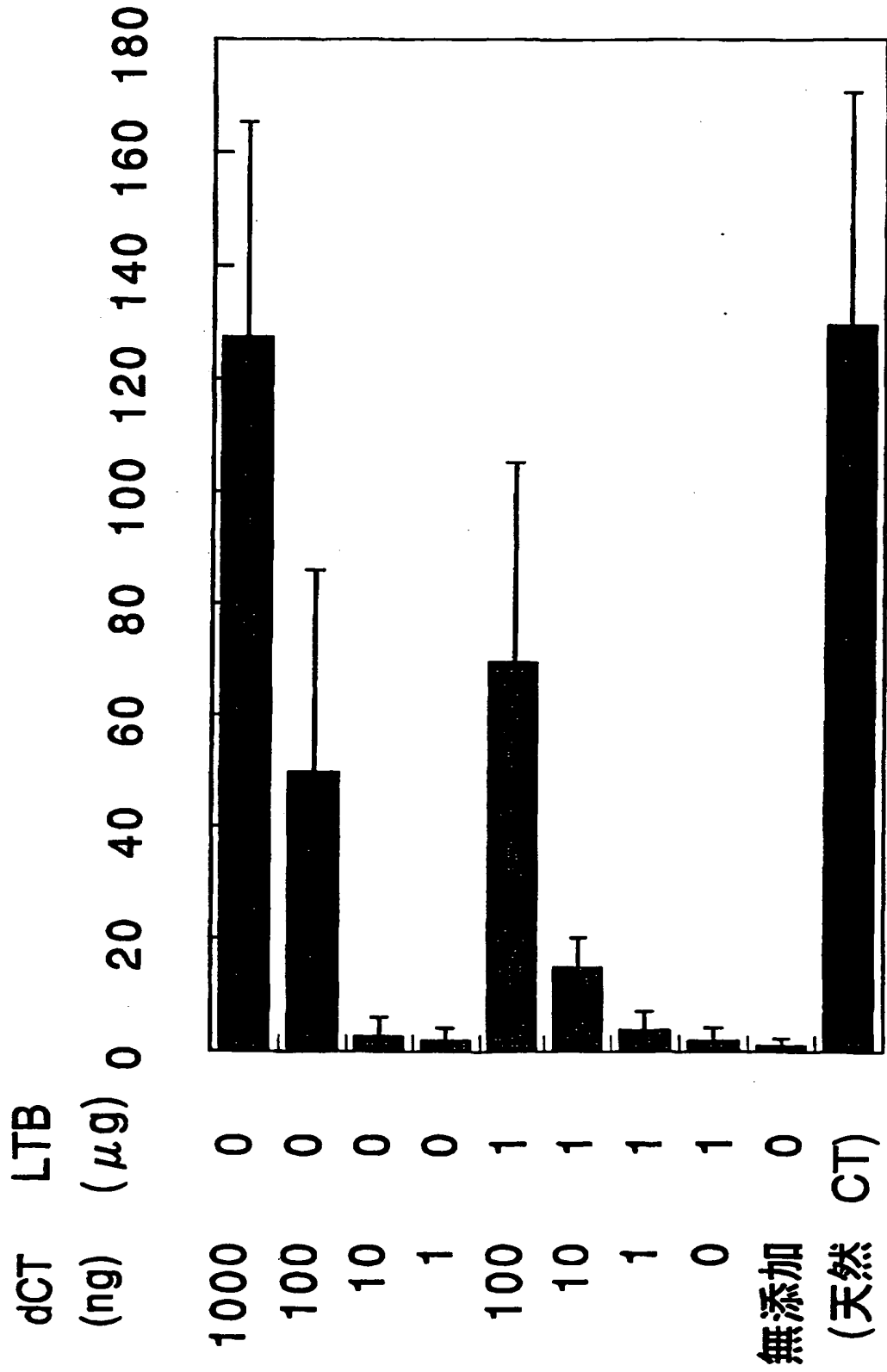
【図 4】





【図5】

足部腫脹 (X1/100mm)



【書類名】要約書

【課題】

本発明は、免疫増強性と安全性に優れたアジュバントと、このアジュバントを用いたワクチンの提供を課題とする。

【解決手段】

残存活性が天然体トキシンの1/2000以下の減毒化トキシンを有効成分として含むアジュバント、並びにこのアジュバントを含むワクチンにより前記課題を解決する。例えば天然コレラトキシンの減毒化体の利用により、経鼻接種においても十分な免疫増強性を示すワクチンを提供する。

【選択図】なし

【書類名】  
【訂正書類】

職権訂正データ  
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

390027214

【住所又は居所】

東京都港区白金5丁目9番1号

【氏名又は名称】

社団法人北里研究所

【代理人】

申請人

【識別番号】

100102978

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】

100108774

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

橋本 一憲

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[390027214]

1. 変更年月日	1992年 4月 3日
[変更理由]	名称変更
住 所	東京都港区白金5丁目9番1号
氏 名	社団法人北里研究所

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**